

Modelos experimentales de hepatocarcinoma

CLARA ALSINET ARMENGOL, VICTORIA TOVAR HERRADOR Y AUGUSTO VILLANUEVA RODRÍGUEZ

Laboratori de Recerca Translacional d'Oncologia Hepàtica. Grupo Barcelona Clinic Liver Cancer. IDIBAPS. CIBEREHD. Unidad de Hepatología. Hospital Clínic. Barcelona. España.

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el quinto tumor en términos de incidencia y la tercera causa de muerte relacionada con cáncer¹. Es una neoplasia con elevada letalidad en el que las tasas de incidencia y mortalidad se superponen. De hecho, menos del 30% de los pacientes diagnosticados de CHC son subsidiarios de tratamientos potencialmente curativos².

La incorporación de los nuevos tratamientos moleculares dirigidos en los recursos terapéuticos contra el cáncer ha revolucionado la oncología moderna. En el caso concreto del CHC, los resultados del ensayo clínico SHARP³, que demuestran un aumento significativo de la supervivencia en pacientes con CHC avanzado tratados con sorafenib, constituyen un hito en la investigación clínica de esta enfermedad. Las repercusiones de este estudio han sido inmediatas: el sorafenib es el nuevo tratamiento estándar en los pacientes con CHC avanzado (estadio C de la clasificación del grupo Barcelona Clinic Liver Cancer), y se ha modificado de forma sustancial el diseño de ensayos clínicos en CHC⁴. Asimismo, merece una especial mención el marcado impulso que ha experimentado la investigación translacional centrada en el desarrollo y validación de nuevas dianas moleculares. En este sentido, los modelos expe-

rimentales preclínicos se han posicionado como herramientas de extremada utilidad para este tipo de estudios.

Modelos experimentales en cáncer

Los modelos experimentales son sistemas biológicos que reproducen características fenotípicas fisiológicas y/o patológicas humanas. A diferencia de la experimentación en humanos, estos modelos soportan grados elevados de manipulación y abarcan diferentes estratos de organización biológica, desde líneas celulares, hasta pequeños mamíferos. En determinadas circunstancias, los modelos experimentales han demostrado ser predictores válidos de eficacia farmacológica en ensayos clínicos en humanos⁵.

Los modelos experimentales in vitro (esto es, líneas celulares) ofrecen gran flexibilidad y son, en la mayoría de casos, la primera aproximación para el estudio de nuevos fármacos. Se han desarrollado numerosas líneas celulares de cáncer hepático, cuyas alteraciones cromosómicas frecuentemente difieren de las alteraciones presentes en CHC humano⁶. No obstante, este tipo de modelo sólo permite evaluar la respuesta celular al fármaco y no es infrecuente que ésta sea sustancialmente distinta de la respuesta del tumor in situ. Además, los estudios en líneas celulares tampoco permiten analizar parámetros relacionados con la biodisponibilidad del compuesto.

Estas limitaciones se superan en los modelos in vivo (esto es, animales de experimentación). Entre ellos, el modelo más sencillo es el xenoinjerto de líneas celulares de tumores humanos, que consiste en la inyección subcutánea de células tumorales en un ratón inmunodeprimido (fig. 1, A₁). El huésped no genera respuesta inmunitaria contra las células y, consiguientemente, éstas son capaces de proliferar y desarrollar un tumor vascularizado. Las ventajas del modelo, que residen en la facilidad para inducir y realizar el seguimiento de los tumores, lo han convertido en la aproximación in vivo más utilizada para el desarrollo de nuevos fármacos desde su establecimiento a finales de la década de 1960⁷. Sin embargo, los xenoinjertos tienen 2 limitaciones importantes: por un lado, la ausencia de respuesta inmunitaria por parte del huésped impide evaluar el papel del microambiente tumoral, y, por otro, las aberraciones genéticas presentes en las líneas celulares reproducen de forma deficitaria los hallazgos en tumores humanos. Recientes

Puntos clave

- La introducción de nuevos tratamientos moleculares dirigidos hace necesario el desarrollo de modelos experimentales que reproduzcan de forma fidedigna la patogenia molecular del hepatocarcinoma.
- Las líneas celulares representan un primer paso en la evaluación de nuevos tratamientos en el hepatocarcinoma, a pesar que con frecuencia presentan aberraciones cromosómicas que difieren de las descritas en tumores humanos. Hay cierta evidencia de una correlación aceptable entre efectividad antitumoral en líneas celulares y en ensayos clínicos en humanos.
- Los modelos experimentales que reproducen más fielmente las alteraciones presentes en el cáncer humano son los animales modificados genéticamente, tejido-específico con expresión inducible. En el hepatocarcinoma, idealmente deben incluir una fase preneoplásica similar a la fibrosis/cirrosis hepática.

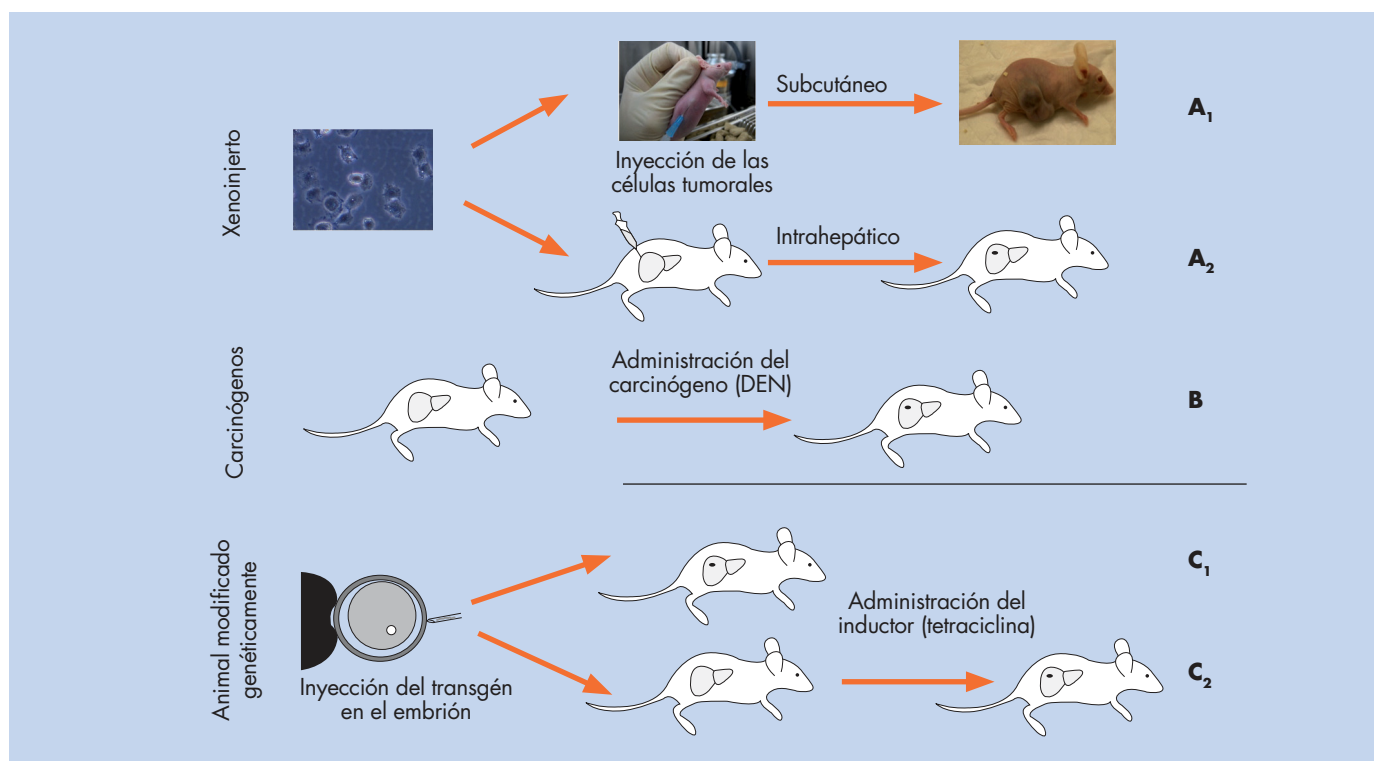


Figura 1. Esquema de los diferentes modelos animales en oncología experimental. Esquemización de la generación de un xenoinjerto subcutáneo (A₁) e intrahepático (A₂) a partir de una línea celular de hepatocarcinoma humano. Modelo de hepatocarcinoma inducida por administración de un carcinógeno (B). Modelo transgénico que expresa el transgén regulado por un promotor específico de hígado (C₁). Modelo transgénico que expresa el transgén regulado por un promotor específico de hígado y dependiente de un inductor que permite el control temporal de la expresión del transgén (C₂). DEN: dietilnitrosamina.

refinamientos de este modelo incluyen los xenoinjertos ortotópicos (fig. 1, A₂), en los que las células tumorales se inyectan en el órgano diana, así como la inyección de disgregados celulares procedentes de tumores humanos en lugar de líneas celulares. Por todo ello, es necesario desarrollar nuevos modelos que reproduzcan de forma fidedigna la patogenia del cáncer en humanos, y que puedan estandarizarse para facilitar estudios comparativos entre diferentes plataformas de investigación. Hasta el momento, los modelos que más se aproximan a este objetivo son los animales modificados genéticamente (AMG). En éstos, determinadas alteraciones genéticas inducidas de forma artificial (p. ej., sobreexpresión o infraexpresión de un gen) permiten el desarrollo tumoral en el órgano diana. Este modelo no está carente de problemas, fundamentalmente relacionados con la mayor complejidad en su generación, así como el elevado coste y tiempo necesario para su obtención.

Modelos animales de hepatocarcinoma

Xenoinjerto

En CHC hay una correlación aceptable entre los resultados de la evaluación terapéutica en xenoinjertos y humanos, tal como demuestra un estudio reciente que comparó la eficacia de la quimioterapia tradicional en diferentes xenoinjertos y ensayos clínicos de CHC⁸. Los resultados in vivo mostraron ausencia de eficacia antitumoral, lo que se corresponde con los resulta-

dos de la quimioterapia sistémica en humanos⁹. Se desconoce con exactitud la reproducibilidad de estos datos con los nuevos tratamientos moleculares. Sin embargo, la concordancia entre los resultados del sorafenib en xenoinjertos de ratón y del ensayo clínico SHARP indican una correlación aceptable¹⁰. Entre los xenoinjertos ortotópicos (fig. 1A₂), cabe destacar el modelo VX2 en conejo. Éste se utiliza con frecuencia en estudios preclínicos no farmacológicos enfocados a la evaluación de tratamientos percutáneos, quimioembolización o diferentes técnicas de imagen¹¹. Finalmente, los xenoinjertos también se han mostrado especialmente útiles para evaluar tratamientos dirigidos contra *cancer stem cells*. En el CHC, esta subpoblación de células tiene rasgos de células progenitoras hepáticas, y hay estudios que indican que pueden ser la causa del mantenimiento de la masa celular tumoral¹². Recientemente, un estudio evaluó la susceptibilidad de una línea celular de CHC enriquecida en una subpoblación de células de probable origen progenitor a diferentes fármacos¹³. Los resultados son todavía preliminares, pero orientan hacia la necesidad de diseñar modelos experimentales que exploren específicamente este compartimento celular en el CHC.

Modelos de hepatocarcinoma inducida por carcinógenos

Los agentes tóxicos empleados de forma más común para la inducción de CHC son la dietilnitrosamina, el tetracloruro de carbono (CCl₄) y la tioacetamida (fig. 1B). Con estas sustan-

cias, se ha conseguido generar CHC en ratón, rata, conejo y otros animales, con un período de inducción tumoral relativamente breve (esto es, 4-12 meses). El motivo de esta corta latencia se debe a que estos agentes inducen un gran número de alteraciones moleculares. La aplicación más interesante de estos modelos es como facilitadores oncogénicos o de daño hepático, usados en combinación con AMG¹⁴.

Animales modificados genéticamente

Dado que más del 80% de los CHC asientan sobre hígado cirrótico, resulta clave que los modelos animales de CHC reproduzcan lo mejor posible el microambiente (esto es, necrosis y regeneración celular) característico del daño hepático crónico. Desgraciadamente, los modelos de fibrosis/cirrosis hepática son complejos y en la bibliografía la mayoría de los modelos de CHC no tienen en cuenta este factor. A continuación se describen algunos de los modelos más relevantes (tabla 1).

Modelos virales

La infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC) es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de CHC¹. Diferentes modelos que sobreexpresan la proteína HBx del VHB¹⁵ o del *core* del VHC¹⁶ han demostrado capacidad oncogénica per se, independientemente del daño hepático causado por la inflamación crónica inducida por el virus. La caracterización de estos modelos demostró la capacidad de la proteína HBx para inducir proliferación celular, así como el efecto en la expresión de genes diana del *core* del VHC y la generación de radicales libres en ausencia de inflamación¹⁷. Entre los modelos virales, destaca el modelo de infección por

el virus de la hepatitis de la marmota. Este modelo reproduce de forma fidedigna la infección crónica y subsiguiente hepatocarcinogénesis asociada al VHB. Presenta, pues, una ventaja doble: la infección neonatal en marmota permite el estudio de tratamientos antivirales, así como de prevención del CHC¹⁸.

Modelos de ciclo celular

p53 es el gen supresor de tumores más extensamente estudiado. En CHC, destaca un modelo animal basado en una mutación en *p53* en heterocigosis, que en el contexto de daño hepático inducido por CCl₄ desarrolla CHC manteniendo *p53* en heterocigosis¹⁹. Este modelo reproduce fielmente los hallazgos descritos en CHC humano con mutaciones en *p53* (generalmente asociado a exposición crónica a aflatoxina B1 sumado a infección por VHB) donde se mantiene una copia funcional de *p53*²⁰. Curiosamente, en otros modelos de cáncer se requiere la pérdida funcional de ambas copias de *p53* para que se desarrolle tumor.

Modelos basados en vías de señalización

Diversos estudios demuestran la activación de diferentes vías de señalización en pacientes con CHC (p. ej., WNT-β-catenina, PI3K/AKT/mTOR²¹, Hedgehog, etc.²²). Esto ha condicionado la generación de modelos que modifican la expresión de diversos componentes de estas vías de señalización, añadiendo solidez a su papel en la patogenia molecular del CHC¹⁴. Un ejemplo paradigmático es el doble transgénico que sobreexpresa los factores de transcripción c-MYC y E2F1²³ (fig. 1C₁). El 100% de estos transgénicos desarrolla CHC moderadamente diferenciados entre los 6 y los 9 meses de vida. Además, en la mayoría de los tumores se observa la activación espontánea de la vía de WNT-β-catenina. Otro ejemplo notable es el *knock-*

Tabla 1. Resumen de modelos animales de carcinoma hepatocelular (CHC)

Genes	Estrategia genética	CHC (meses de latencia)	Comentarios	Referencia
Modelos virales				
HBx	Región reguladora de la misma proteína	Primeros casos de CHC a los 13 meses		Koile et al ¹⁵
VHC core	Región reguladora de la proteína HBx	33% de CHC (16-23 meses)	Esteatosis desde los 3 meses	Moriya et al ¹⁶
Modelos de ciclo celular				
<i>p53</i> + <i>mTERT</i>	KO en heterocigosis de <i>p53</i> (+/-) y KO de <i>mTERT</i> (-/-)	30-40% de CHC (12 meses)	Inducción de daño hepático por CCl ₄ . Se mantiene <i>p53</i> +/- en los tumores	Farazi et al ¹⁹
Modelos basados en vías de señalización				
<i>c-MYC</i> + <i>E2F1</i>	Región reguladora de la albúmina para ambos genes	100% de CHC (9 meses)	Se observa activación de β-catenina en todos los tumores analizados. Bitransgénico	Calvisi et al ²³
<i>PTEN</i>	KO en hígado (-/-). Recombinasa cre bajo la región reguladora de la albúmina	66% de CHC (18 meses)	Bitransgénico	Horie et al ²⁴
<i>Met</i>	Regulación por tetraciclina en hígado	60% de CHC (12 meses)	Adicción oncogénica	Wang et al ²⁵
<i>TGF-α</i> + <i>IGF-2</i>	<i>TGF-α</i> : región reguladora de la albúmina. <i>IGF-2</i> : KO +/- e <i>imprinting</i>	100% de CHC (18 meses)	100% de los tumores han perdido el <i>imprinting</i> y expresan <i>IGF-2</i> . Bitransgénico	Harris et al ²⁸

CCl₄: tetracloruro de carbono; KO: *knock-out*.

out hepatoespecífico (fig. 1C₁) del supresor tumoral PTEN (vía de PI3K/AKT/mTOR). En éste, la incidencia de CHC es del 66% a los 18 meses²⁴.

Los modelos inducibles (fig. 1C₂) son AMG que permiten la estimulación y/o inhibición controlada de la expresión del gen de interés mediante la administración de tetraciclina o análogos. Estos modelos son de especial utilidad en los genes cuya desregulación es letal en estadios tempranos del desarrollo embrionario. La utilización de estos modelos ha permitido profundizar en el estudio del fenómeno de adicción oncogénica. Este fenómeno se fundamenta en que el crecimiento tumoral depende básicamente de una alteración molecular concreta de entre las múltiples que haya podido acumular. En un modelo inducible basado en el receptor del *hepatocyte growth factor* (MET), se consiguió una reducción significativa en el tamaño tumoral una vez inducida la infraexpresión del gen que codifica ese receptor (fig. 1C₂)²⁵. Este fenómeno se ha descrito para numerosos genes en diferentes tumores²⁶.

Por último, es importante destacar el análisis comparativo de los patrones de expresión génica de CHC obtenido de muestras humanas y modelos de AMG. Este análisis permitió clasificar diferentes modelos animales en función de la similitud en su expresión génica con distintos subgrupos moleculares de CHC en humanos. Estos modelos serán extremadamente útiles a la hora de testar fármacos activos frente a determinadas vías de señalización²⁷.

Conclusión

Los AMG usados en la investigación biomédica han proporcionado información de gran relevancia para el avance en el conocimiento del cáncer humano. No obstante, el desarrollo de nuevos tratamientos moleculares (p. ej., sorafenib), unido al creciente interés en la patogenia molecular del CHC, ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos modelos experimentales que mimeticen de forma fiel las alteraciones genéticas presentes en el CHC humano.

Este salto cuantitativo incluirá la génesis de modelos que desarrollen CHC en hígado cirrótico, así como su caracterización molecular precisa. Conceptualmente, este desarrollo debería ir parejo al conocimiento de las diferentes subclases moleculares de CHC en humanos. Sin duda, esto constituirá la base racional y el primer paso para el desarrollo de medicina personalizada basada en modelos experimentales.

Bibliografía



● Importante ● Muy importante

■ Ensayo clínico controlado

1. El Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132:2557-76.
2. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003;362:1907-17.
3. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359:378-90.
4. Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:698-711.
5. Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res*. 2003;9:4227-39.
6. Zimonjic DB, Keck CL, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Novel recurrent genetic imbalances in human hepatocellular carcinoma cell lines identified by comparative genomic hybridization. *Hepatology*. 1999;29:1208-14.
7. Rygaard J, Povlsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1969;77:758-60.
8. Huynh H, Soo KC, Chow PK, Panasci L, Tran E. Xenografts of human hepatocellular carcinoma: a useful model for testing drugs. *Clin Cancer Res*. 2006;12(14 Pt 1):4306-14.
9. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005;42:1208-36.
10. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res*. 2006;66:11851-8.
11. Gupta T, Virmani S, Neidt TM, Szolc-Kowalska B, Sato KT, Ryu RK, et al. MR tracking of iron-labeled glass radioembolization microspheres during transcatheter delivery to rabbit VX2 liver tumors: feasibility study. *Radiology*. 2008;249:845-54.
12. Sell S, Leffert HL. Liver cancer stem cells. *J Clin Oncol*. 2008;26:2800-5.
13. Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene*. 2008;27:1749-58.
14. ●● Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2008;48:858-79.
15. ● Koike K, Moriya K, Iino S, Yotsuyanagi H, Endo Y, Miyamura T, et al. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology*. 1994;19:810-9.
16. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med*. 1998;4:1065-7.
17. Koike K. Hepatocarcinogenesis in hepatitis viral infection: lessons from transgenic mouse studies. *J Gastroenterol*. 2002;37(Suppl 13):55-64.
18. Tennant BC, Toshkov IA, Peek SF, Jacob JR, Menne S, Hornbuckle WE, et al. Hepatocellular carcinoma in the woodchuck model of hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S283-S293.
19. Farazi PA, Glickman J, Horner J, DePinho RA. Cooperative interactions of p53 mutation, telomere dysfunction, and chronic liver damage in hepatocellular carcinoma progression. *Cancer Res*. 2006;66:4766-73.
20. Yumoto Y, Hanafusa T, Hada H, Morita T, Ooguchi S, Shinji N, et al. Loss of heterozygosity and analysis of mutation of p53 in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 1995;10:179-85.
21. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, et al. Pivotal Role of mTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2008;135:1972-83.
22. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*. 2007;27:55-76.
23. Calvisi DF, Conner EA, Ladu S, Lemmer ER, Factor VM, Thorgeirsson SS. Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway confers growth advantages in c-Myc/E2F1 transgenic mouse model of liver cancer. *J Hepatol*. 2005;42:842-9.
24. Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest*. 2004;113:1774-83.
25. Wang R, Ferrell LD, Faouzi S, Maher JJ, Bishop JM. Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J Cell Biol*. 2001;153:1023-34.
26. ●● Van Dyke T, Jacks T. Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell*. 2002;108:135-44.
27. ● Lee JS, Chu IS, Mikaelyan A, Calvisi DF, Heo J, Reddy JK, et al. Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nat Genet*. 2004;36:1306-11.
28. Harris TM, Rogler LE, Rogler CE. Reactivation of the maternally imprinted IGF2 allele in TGFalpha induced hepatocellular carcinomas in mice. *Oncogene*. 1998;16:203-9.

Bibliografía recomendada

Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2008;48:858-79.

Esta revisión presenta una relación exhaustiva de los modelos animales que se han generado hasta el momento para el estudio del carcinoma hepatocelular. También se enumeran algunos de los modelos de fibrosis/cirrosis más relevantes.

Sharpless NE, DePinho RA. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:741-54.

Esta revisión analiza la situación de los modelos murinos preclínicos en el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer. Describe las limitaciones principales de los xenoinjertos y las causas por las que esta estrategia se ha generalizado.

Asimismo, el artículo presenta el potencial de los animales modificados genéticamente para estudios con fármacos.

Thorgeirsson SS, Lee JS, Grisham JW. Functional genomics of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2006;43(2 Suppl 1):S145-S150.

En este artículo se introduce de manera estructurada el concepto de genómica funcional integral en hepatocarcinoma. Se presentan los resultados de integrar datos de expresión génica procedentes de un grupo de muestras de humanas y de modelos murinos de carcinoma hepatocelular (CHC). El objetivo final es adecuar cada uno de los modelos a cada una de las subclases moleculares del CHC.

Van Dyke T, Jacks T. Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell.* 2002;108:135-44.

Descripción detallada de diferentes estrategias de ingeniería genética, sus aplicaciones y contribuciones para el desarrollo de modelos murinos en el estudio del cáncer.